

THESIS

Munich. 1963

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
350 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

Untersuchungen am Menschen
zur Frage der Wirkungssteigerung
cutan applizierter Salizyl- und Huminsäure
bei kombinierter Anwendung am Beispiel
des Farbstoff-Hyaluronidase-Spreadings

von

ELISABETH PROBST

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
(Direktor: Professor Dr. W. Seitz)

Untersuchungen am Menschen zur Frage der Wirkungssteigerung
cutan applizierter Salizyl- und Huminsäure bei kombinierter
Anwendung am Beispiel des Farbstoff-Hyaluronidase-Spreadings

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Elisabeth Probst
aus
Weilheim /Obb.

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. W. Seitz

Dekan: Professor Dr. R. Bachmann

Tag der mündlichen Prüfung: 15. 10. 1963

Inhaltsverzeichnis

Problematik	4
Eigene Versuche	6
Methodik	6
Versuchsreihen	7
Versuchsergebnisse	7
Statistische Auswertung	10
Diskussion	20
Zusammenfassung	21
Literaturverzeichnis	22

Problematik

Auf die ätiologische Bedeutung einer beim Rheumatismus erhöhten Kapillarpermeabilität ¹⁻³ wurde in den letzten Jahren mehrfach hingewiesen. Es kommt dabei zu einem perivaskulären Ödem durch die aus den Kapillaren austretende Flüssigkeit. Das Hyaluronsäure-Hyaluronidasesystem ist ein entscheidender Faktor bei der Aufrechterhaltung einer normalen Gefäßpermeabilität ⁴. Chemisch stellt die Hyaluronsäure ein Mucopolysaccharid dar, und dazu eine der Komponenten der Grundsubstanz. Der Polymerisationsgrad der Mucopolysaccharidsäuren wird durch die jeweilige Hyaluronidaseaktivität bestimmt. Da bei vermehrter Hyaluronidaseaktivität die Mucopolysaccharidsäuren durch Depolymerisation und Hydrolyse eine erhöhte Permeabilität der Zwischenzellsubstanz bedingen. Demnach scheint es nicht verwunderlich, daß bei allen antirheumatisch wirksamen Substanzen und Methoden eine hyaluronidasehemmende Wirkung nachgewiesen werden konnte ⁵⁻⁷.

Ein besonderes Interesse hinsichtlich der hyaluronidasehemmenden Wirkung beanspruchten die balneologischen, antirheumatischen Behandlungsmethoden. Die dahingehende Wirkung des Moores wurde von Mathies und Mitarbeiter ⁸⁻¹¹ in Tierversuchen auf dem gleichen Prinzip wie der unten angegebenen Methodik aufgezeigt. Eine wesentliche Bedeutung wird dabei den Huminsäuren zugesprochen.

Durch Keratolyse findet die Salizylsäure gut Eingang in die Haut ¹². Sie wird deshalb schon lange bei der cutanen Behandlungsweise angewendet. Ihre hyaluronidasehemmende Wirkung ist durch Guerra, Kvasniewski, Schoen, Dry und Butt, Dorfman, Swyer, Forrest und Mitarbeiter ¹³⁻²⁴ nachgewiesen bzw. beschrieben worden.

Lutz ²⁵ hat die hyaluronidasehemmende Wirkung der Salizylsäure bei cutaner Anwendung festgestellt. Außerdem wurde durch Lutz in Tierversuchen die Wirkungssteigerung durch die Kombination von Salizylsäure und Huminsäure geprüft. Es ist nun am Menschen die Wirkungssteigerung cutan applizierter Salizylsäure

und Huminsäure bei kombinierter Anwendung zu prüfen. Dies geschieht am Beispiel des Farbstoff-Hyaluronidase-Spreading-Tests, nach dem W i n d s h e i m e r ²⁶ die hyaluronidasehemmende Wirkung von Salizylsäure und Huminsäure allein beim Menschen bereits nachweisen konnte.

Eigene Versuche

Methodik

Als Grundlage zur Berechnung der Hyaluronidasehemmung diente der Spreadingeffekt. Je eine intracutane Farbstoffquaddel von 0,1 ccm einer 0,1%igen Patentblaulösung (deren Farbwirkung nach 3 Tagen spätestens nicht mehr feststellbar ist) und eine Quaddel der gleichen wie die bei der Farbstoffquaddel verwendeten Menge, in der 7,5 I.E. Hyaluronidase gelöst waren (Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel), wurde vor und zu verschiedenen Zeiten nach dem Bade in die vorher mit Alkohol gereinigte Haut des Bauches unterhalb des Nabels gesetzt. Die nach 10 min erreichte Ausbreitung der Farbstoff-Flecken wurde auf einen Zelluloidstreifen übertragen und der Flächeninhalt planimetrisch bestimmt.

Es ist bekannt, daß sich eine intracutan applizierte Farbstofflösung rascher ausbreitet, wenn dieser Hyaluronidase zugesetzt ist. Die Reduktion der Hyaluronidaseaktivität bestimmt das Ausmaß der Hemmung, die die Ausbreitung der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel unter dem Einfluß einer hyaluronidasehemmend wirkenden Substanz erfährt.

Das Bad dauerte 20 Minuten bei einer Temperatur von 37°C. Die Versuchszeiten waren für sämtliche Versuche: 0', 15', 30', 45', 60', 75' und 90' nach Beendigung des Bades. Insgesamt wurden somit je 8 Quaddeln jedes Quaddeltypus einschließlich des Leerwertes vor der Badeapplikation gesetzt. Im Gegensatz zu früher beschriebenen Tierexperimenten²⁰ konnten diese Quaddeln bei den hier vorliegenden Untersuchungen am Menschen jeweils am gleichen Versuchsteilnehmer gesetzt werden. Hierdurch wird die Präzision in der Aussage über das Versuchsergebnis wesentlich erhöht. Die Salizylsäure wurde als freie Salizylsäure mit 25,0g/150 l Wasser, die Huminsäure als Natriumhuminat mit 5,0 g/150 l Wasser appliziert. Der Anteil des Netzmittels im Kontrollversuch betrug 5,0 g/150 l Wasser.

Versuchsreihen

1. Versuchsreihe

In der 1. Versuchsreihe wurde die Hyaluronidasehemmung nach einem 20-Minuten-Bad in Na-Huminat+Salizylsäure+Netzmittel in der angegebenen Verdünnung bei 4 Probanden nach oben beschriebener Methode bestimmt.

2. Versuchsreihe

In der 2. Versuchsreihe wurde als Kontrollversuch die Hyaluronidasehemmung nach einem 20-Minuten-Bad, bei dem dem Badewasser Netzmittel allein zugefügt wurde, bei 4 Probanden bestimmt.

Versuchsergebnisse

Die Versuchsergebnisse bei den Untersuchungen zur Frage der Wirkungssteigerung als Badezubereitung applizierter Salizylsäure und Huminsäure bei kombinierter Anwendung zeigen eine deutliche Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität (Tabelle 1). Das 20-Minuten-Bad in einem Wasserbad mit Netzmittel zeigte keinerlei hyaluronidasehemmende Wirkung (Tabelle 2).

Zeit	F	FH		F	FH
leer	69	122	leer	65	118
0'	70	86		67	79
15'	69	82		65	75
30'	71	84		69	78
45'	73	102		68	88
60'	70	114		64	97
75'	69	117		67	111
90'	71	118		67	115

Versuchsreihe 1
(Versuchsperson 1)

Versuchsreihe 1
(Versuchsperson 2)

Zeit	F	FH		F	FH
leer	84	132	leer	64	105
0'	80	95		62	70
15'	87	92		62	66
30'	82	96		65	71
45'	86	109		62	87
60'	82	118		61	100
75'	83	126		64	106
90'	85	128		62	107

Versuchsreihe 1
(Versuchsperson 3)

Versuchsreihe 1
(Versuchsperson 4)

T a b e l l e 1

Zeit	F	FH		F	FH	
leer	73	117		leer	69	105
0'	72	115		68	102	
15'	69	107		69	96	
30'	73	105		71	99	
45'	74	108		73	101	
60'	74	103		74	106	
75'	69	109		72	113	
90'	68	111		72	113	

Versuchsreihe 2
(Versuchsperson 1)

Versuchsreihe 2
(Versuchsperson 2)

Zeit	F	FH		F	FH	
leer	81	122		leer	87	133
0'	79	113		90	129	
15'	84	118		91	127	
30'	84	121		92	131	
45'	78	123		89	133	
60'	76	123		88	131	
75'	80	127		91	128	
90'	82	124		92	135	

Versuchsreihe 2
(Versuchsperson 3)

Versuchsreihe 2
(Versuchsperson 4)

T a b e l l e 2

Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse

1. Statistische Methodik

Primäre Aufgabe der statistischen Auswertung von Versuchsergebnissen ist es, die experimentelle Variabilität zu schätzen. Dies geschieht in der Weise, daß man aus der Gesamt-Variabilität der beobachteten Meßwerte diejenigen Anteile eliminiert, die sich auf systematische Faktoren zurückführen lassen. Bei der hier vorliegenden Versuchsanordnung waren folgende systematische Faktoren zu berücksichtigen:

1. Individuelle Reaktionslage des Versuchsteilnehmers;
2. Zeitpunkt innerhalb des Versuches, zu dem die Quaddel gesetzt wurde.

Zur Schätzung der experimentellen Variabilität zogen wir Varianz-Analysen heran, denen ein lineares statistisches Modell zugrunde liegt. Die experimentelle Variabilität wurde dabei für die beiden Quaddel-Typen getrennt geschätzt.

Unter den 8 "Stufen" einer Versuchsreihe verstehen wir die einzelnen Zeitpunkte einschließlich der Kontrolle, zu denen Quaddeln gesetzt wurden. Unter "Versuchs-Zeiten" verstehen wir lediglich diejenigen Quaddeln, die nach dem Mad gesetzt wurden. Das lineare statistische Modell, das den Varianz-Analysen zugrunde liegt, geht von der Annahme aus, daß in 1. Näherung der Einfluß der beiden systematischen Faktoren "Stufen" und "Versuchsteilnehmer" voneinander unabhängig ist und sich in additiver Weise überlagert. Bezeichnet $x(V;S)$ den am Versuchsteilnehmer V in der Versuchsstufe S beobachteten Meßwert, so wird angenommen, daß sich dieser Meßwert wie folgt darstellen läßt:

$$x(V;S) = a_V + b_S + K + \epsilon_{VS}.$$

Hierin bedeutet a_V eine Konstante, die nur von dem Versuchsteilnehmer abhängt und dessen Einfluß auf das Versuchsergebnis zum Ausdruck bringt; b_S eine Konstante, die nur von der jeweiligen Stufe des Versuches abhängt und deren Einfluß auf das Versuchsergebnis ausdrückt. Die Konstante K dient zu Zwecken der Normierung;

sie wird so bestimmt, daß im Mittel über alle Versuchswerte die Einflüsse der Versuchsteilnehmer und diejenigen der Versuchsstufen 0 werden. Die Größe $\xi_{V,S}$ ist eine "zufallsveränderliche", welche die zufällige Abweichung des tatsächlich beobachteten Meßwertes von dem "Erwartungswert" des linearen statistischen Modells zum Ausdruck bringt. Es wird angenommen, daß die Variabilität dieser Zufallsveränderlichen unabhängig ist von dem jeweiligen Versuchsteilnehmer und der jeweiligen Versuchsstufe; sie wird in den Varianz-Analysen als experimentelle Variabilität geschätzt.

Die Schätzung der experimentellen Variabilität in den Varianz-Analysen erfolgt in der Weise, daß zunächst aus der Gesamt-Variabilität diejenigen Anteile ausgesondert werden, welche als Folge der systematischen Faktoren angesehen werden müssen (Varianz zwischen Patienten; Varianz zwischen Stufen). Die nach Eliminierung dieser systematischen Faktoren noch verbleibende Variabilität wird als Rest-Varianz bezeichnet und zur Schätzung der experimentellen Variabilität herangezogen.

Neben der Schätzung der experimentellen Variabilität hat die statistische Auswertung auch noch die Schätzung der Konstanten vorzunehmen, die in dem statistischen Modell enthalten sind. Für die hier vorliegende Fragestellung interessiert jedoch tatsächlich nur die Schätzung der Konstanten b_S ; tatsächlich interessiert sogar nur die Differenz zwischen den zu zwei verschiedenen Stufen gehörigen Konstanten. Die Schätzung dieser Differenz geschieht in folgender Weise. Bezeichnet zunächst $\bar{x}(S)$ das arithmetische Mittel der in einer Versuchsstufe bei allen Versuchsteilnehmern beobachtete Meßwerte, so ist diese Größe ein Schätzwert für $b_S + K$, d.h. es ist

$$\bar{x}(S) \sim b_S + K.$$

Die Mittelwertsdifferenz $\bar{x}(S_1) - \bar{x}(S_2)$ stellt somit eine Schätzung für die Differenz zwischen den Konstanten dar, welche den systematischen Einfluß der beiden Versuchsstufen S_1 und S_2 zum Ausdruck bringen,

$$\bar{x}(S_1) - \bar{x}(S_2) \sim b_{S_1} - b_{S_2}.$$

Von besonderem Interesse ist in dem hier vorliegenden Zusammenhang der Unterschied zwischen den Kontroll-Quaddeln und den Quaddeln zu den verschiedenen Versuchszeiten. Diesen Unterschied zu dem Zeitpunkt t bezeichnen wir mit

$$D(t) = \bar{x}(t) - \bar{x}(K) \quad b_t - b_K$$

Zur Schätzung eines statistischen Parameters gehört auch die Angabe der Präzision, mit welcher dieser Parameter geschätzt werden kann. Hierzu ist es üblich, das 95%-Vertrauensintervall für den geschätzten Parameter anzugeben. Dieses Vertrauensintervall sagt aus, welche Abweichung maximal zwischen dem Schätzwert und der geschätzten Größe vorliegen kann, wobei angenommen wird, daß dieser Maximalwert höchstens in 5% der Fälle überschritten wird. Als Grundlage für die Berechnung der Vertrauensintervalle dient die geschätzte experimentelle Variabilität.

Die vorliegende Versuchsanordnung gestattet kein Urteil darüber, ob das gewählte statistische Modell den realen Sachverhalt zutreffend wiedergibt. Einen gewissen Anhaltspunkt kann man allerdings aus der Größe der Varianzen $s^2(S)$ zwischen den Meßwerten der gleichen Versuchsstufe an den verschiedenen Patienten gewinnen. Trifft das gewählte statistische Modell zu, so muß erwartet werden, daß diese Varianzen für die verschiedenen Versuchsstufen praktisch den gleichen Wert besitzen; d.h. daß sie untereinander homogen sein müssen. Ob dies zutrifft, kann mit Hilfe des Bartlett-Tests geprüft werden. Wir haben diese Prüfung für sämtliche Versuchsreihen durchgeführt; das Ergebnis zeigt, daß zumindest in dieser Hinsicht das gewählte statistische Modell als zutreffend angesehen werden kann.

2. Darstellung der Ergebnisse der statistischen Auswertung

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind in den Tabellen 3-6 wiedergegeben; jede dieser Tabellen besteht aus 2 Teilen, in dem einen Teil sind die Varianz-Analysen dargestellt, in dem anderen Teil sind die Stichprobenparameter "Mittelwert und Varianzen" angegeben.

In den Tabellen der Varianz-Analysen bedeutet

n : Zahl der Freiheitsgrade der Varianz-Komponente;

- SAQ: Summen-Abstands-Quadrat der Varianz-Komponente;
MAQ: Mittleres-Abstands-Quadrat der Varianz-Komponente;
 $F_{\text{emp.}}$: Varianz-Quotient zwischen der Varianz-Komponente
und der Rest-Varianz;
p: Überschreitungswahrscheinlichkeit, die dem Varianz-
Quotienten $F_{\text{emp.}}$ in der zugehörigen F-Prüfverteilung
maximal zukommt.

Am Fuße jeder Varianz-Analyse ist das Ergebnis des Bartlett-Tests angegeben; hierin bedeutet:

- n: Zahl der Freiheitsgrade der Chi-Quadrat-Prüfverteilung;
 $\chi^2_{\text{emp.}}$: Prüfgröße des Bartlett-Tests;
p: Überschreitungswahrscheinlichkeit, welche der Prüfgröße $\chi^2_{\text{emp.}}$ in der zugehörigen Chi-Quadrat-Prüfverteilung mindestens zukommt.

Außerdem haben wir am Fuße der Varianz-Analysen die Präzisionsmaße angegeben, die sich aus den Schätzungen der experimentellen Variabilität ergaben. Es bedeutet hierin:

- n: Streuung der Einzelwerte um ihren "Erwartungswert";
 σ_1 : 95%-Vertrauensintervall für das arithmetische Mittel $\bar{x}(S)$;
 σ_2 : 95%-Vertrauensintervall für die Differenz zwischen zwei Mittelwerten, insbesondere für die Differenz $D(t)$.

Alle diese Ergebnisse sind getrennt für die reine Farbstoff-Quaddel und für die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel angegeben.

In dem zweiten Teil der Tabelle haben wir zunächst für die einzelnen Stufen die Größen der Mittelwerte $\bar{x}(S)$ angegeben, außerdem die Größe der geschätzten Varianzen $s^2(S)$ innerhalb der Werte einer Stufe zwischen den verschiedenen Patienten. Diese Varianzen wurden dann im Bartlett-Test auf ihre Homogenität hin geprüft.

In diesem Teil der Tabellen ist außerdem der Schätzwert $D(t) = \bar{x}(t) - \bar{x}(K)$ für den Unterschied in der Ausbreitung des betreffenden Quaddel-Typus zum Zeitpunkt t gegenüber der Kontrolle angegeben. Für die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel ist

die übliche Umrechnung dieser Mittelwertsdifferenz in eine prozentuale Hemmung in der Spalte "Hemmung" angegeben. Die Irrtumswahrscheinlichkeit, mit welcher behauptet werden kann, daß eine Mittelwertsdifferenz $D(t)$ statistisch gesichert von 0 verschieden ist, wurde in der Spalte "Sicherung" dieser Tabellen angegeben. Da eine solche statistische Sicherung allerdings nur vorliegt, wenn diese Irrtumswahrscheinlichkeit maximal den Wert 5% besitzt, haben wir nur in diesem Falle die Irrtumswahrscheinlichkeit angeführt. In allen anderen Fällen müßte diese Irrtumswahrscheinlichkeit mit einem Wert veranschlagt werden, der über 5% liegt.

3. Diskussion der Ergebnisse der statistischen Auswertung

Der Bartlett-Test ergab in jedem Fall Prüfgrößen, deren Überschreitungswahrscheinlichkeit wesentlich größer als 50% sind. Dies bedeutet, daß die Hypothese der Homogenität der Varianzen, die miteinander verglichen wurden, beibehalten werden kann; darüber hinaus bedeutet dies, daß zumindest in dieser Richtung das gewählte statistische Modell den realen Sachverhalt zutreffend wiedergibt.

Nunmehr sei das Ergebnis der statistischen Auswertung hinsichtlich des Verhaltens der reinen Farbstoff-Quaddel bzw. der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel für die einzelnen versuchsreihen getrennt besprochen.

Versuchsreihe 1:

Für die reine Farbstoff-Quaddel ergeben sich keinerlei Hinweise dafür, daß diese durch das Dad in statistisch gesicherter Weise beeinflußt wird.

Bei der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel liegen dagegen statistisch hoch gesicherte Unterschiede zwischen den Versuchsstufen vor. Es zeigt sich, daß bis zu dem Zeitpunkt 60' nach dem Dad statistisch hoch gesicherte Hemmungen in der Ausbreitung der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel vorliegen, zum Zeitpunkt 75' liegt noch eine statistisch schwach gesicherte Hemmung der Ausbreitungsgeschwindigkeit dieses Quaddeltypus vor.

Die Versuchsvariabilität in dieser Versuchsreihe ist sehr klein; sie hängt jedoch etwas von dem Quaddeltypus ab. Bei der reinen Farbstoffquaddel ist sie erheblich kleiner als bei der Farbstoff+

Hyaluronidase-Quaddel. Aus der Größe der Vertrauensintervalle σ_2 ergibt sich, daß für die reine Farbstoffquaddel bereits eine Mittelwertsdifferenz von maximal 3 mm^2 und bei der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel eine Mittelwertsdifferenz von maximal 4 mm^2 als reale Wirkungen des Bades angesehen werden können.

Versuchsreihe 2:

Hier konnte weder für die reine Farbstoffquaddel noch für die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel eine statistisch gesicherte Veränderung in der Ausbreitung dieser Quaddeltypen nach dem Bade gegenüber den Kontrollen festgestellt werden. Ein Einfluß des Netzmittels auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit der beiden Quaddeltypen kann somit als ausgeschlossen gelten. Allerdings muß bemerkt werden, daß die experimentelle Variabilität bei dem Netzmittel etwas größer ist als bei einem Wasserbad, bei dem durch W i n d s h e i m e r ein Mittelwertsunterschied von 5 mm^2 als real angesehen wurde gegenüber 6 mm^2 bei einem Netzmittelbad.

Dennoch muß auch hier die gemachte Aussage als sehr präzise angesehen werden. Es ist bemerkenswert, daß, wie W i n d s h e i m e r zeigen konnte, die Mittelwertsdifferenzen $D(t)$ für gleiche Zeitpunkte sich zwischen den einzelnen Wirksubstanzen kaum unterscheiden. Dies zeigt zunächst, daß die Hyaluronidasehemmung eines Huminsäurebades und diejenige eines Salizylsäure-Bades sich praktisch nicht unterscheiden.

Andererseits bedeutet dies, daß durch die Kombination dieser beiden Wirksubstanzen hinsichtlich der Hyaluronidasehemmung kein stärkerer Effekt erzielt werden kann; dies zeigen auch die völlig analogen Untersuchungsergebnisse bei kombinierter Anwendung von Salizylsäure und Huminsäure zu den Ergebnissen, die W i n d s h e i m e r bei getrennter Applikation erzielen konnte.

Farbstoff-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
ischen Patienten	3	1.984	661,3	100,00	0,1%
ischen Stufen	7	28	4,0	1,48	-
st-Varianz	21	57	2,7		
esamt-Varianz	31	2.069	66,7		

$$= 7; \chi^2_{\text{emp.}} = 0,902; p > 99\%$$

$$s = 1,6475$$

$$\zeta_1 = 1,7131$$

$$\zeta_2 = 2,4226$$

Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
ischen Patienten	3	2.387	795,7	100,00	0,1%
ischen Stufen	7	8.088	1.155,4	100,00	0,1%
Komponente 1. Grades	1	1.447	1.446,7	100,00	0,1%
" 2. Grades	1	3.800	3.800,0	100,00	0,1%
" 3. Grades	1	2.679	2.679,1	100,00	0,1%
" 4. Grades	1	122	121,9	18,47	0,1%
" 5. Grades	1	8	7,7	1,17	-
" 6.u.höh.Gr.	2	32	16,0	2,42	-
st-Varianz	21	140	6,6		
esamt-Varianz	31	10.615	342,4		

$$7; \chi^2_{\text{emp.}} = 0,384; p > 99\%$$

$$s = 2,5820$$

$$\zeta_1 = 2,6848$$

$$\zeta_2 = 3,7968$$

T a b e l l e 3

(Varianz-Analysen Versuchsreihe 1)

Farbstoff-Quaddel				
	$\bar{x}(S)$	$s^2(S)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(K)$	Sicherung
v	71	85,7		
0'	70	57,7	- 1	-
15'	71	125,7	0	-
30'	72	53,0	+ 1	-
45'	72	104,3	+ 1	-
60'	69	86,3	- 2	-
75'	71	71,0	0	-
90'	71	97,7	0	-

Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel				
	$\bar{x}(S)$	$s^2(S)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(K)$	Sicherung
v	119	125,0		
0'	82	112,3	- 37	0,1%
15'	79	121,0	- 40	0,1%
30'	82	112,3	- 37	0,1%
45'	96	116,3	- 23	0,1%
60'	107	106,3	- 12	0,1%
75'	115	74,0	- 4	5,0%
90'	117	75,3	- 2	-

T a b e l l e 4

(Mittelwerte und Varianzen Versuchsreihe 1)

Farbstoff-Quaddel					
Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
wischen Patienten	3	1.930	643,3	100,00	0,1%
wischen Stufen	7	20	2,8	-	
est-Varianz	21	134	6,4		
esamt-Varianz	31	2.084	67,2		
= 7; $\chi^2_{\text{emp.}} = 1,318$; p > 98%			s = 2,5261		
			$\sigma_1 = 2,6266$		
			$\sigma_2 = 3,7146$		

Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel					
Varianz-Komponente	N	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
wischen Patienten	3	3.426	1.142,0	68,38	0,1%
wischen Stufen	7	254	36,3	2,17	-
est-Varianz	21	352	16,7		
esamt-Varianz	31	4.032	130,1		
= 7; $\chi^2_{\text{emp.}} = 0,825$; p > 99%			s = 4,0941		
			$\sigma_1 = 4,2570$		
			$\sigma_2 = 6,0204$		

T a b e l l e 5
(Varianz-Analysen Versuchsreihe 2)

Farbstoff-Quaddel				
	$\bar{x}(S)$	$s^2(S)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(K)$	Sicherung
v	77	65,0		
0'	77	93,0	0	-
15'	78	122,3	+ 1	-
30'	80	96,7	+ 3	-
45'	78	53,7	+ 1	-
60'	78	45,3	+ 1	-
75'	78	96,7	+ 1	-
90'	78	115,7	+ 1	-

Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel				
	$\bar{x}(S)$	$s^2(S)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(K)$	Sicherung
v	119	135,0		
0'	115	123,0	- 4	-
15'	112	180,7	- 7	-
30'	114	214,7	- 5	-
45'	116	208,0	- 3	-
60'	116	181,0	- 3	-
75'	119	93,7	0	-
90'	121	123,0	+ 2	-

T a b e l l e 6

(Mittelwerte und Varianzen Versuchsreihe 2)

Diskussion

Bei den Untersuchungen am Menschen zur Frage der Wirkungssteigerung cutan applizierter Salizylsäure und Huminsäure bei kombinierter Anwendung haben die Ergebnisse gezeigt, daß eine deutliche Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität mit einem Maximum (Mittelwertsdifferenz -40 mm^2) nach Beendigung des 20 Minuten dauernden Bades vorhanden ist. Bis zum Zeitpunkt 60' nach dem Bade ist diese Hemmung statistisch hoch gesichert zu verzeichnen, zum Zeitpunkt 75' nach dem Bad liegt noch eine schwach gesicherte Hemmung vor. W i n d s h e i m e r ²¹ hat bereits nachgewiesen, daß bei getrennter Anwendung von Natriumhuminat und Salizylsäure eine maximale Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität 15 Minuten nach dem Bade vorhanden ist. Die Mittelwertsdifferenzen liegen hier bei -37 mm^2 für die Salizylsäure und -36 mm^2 für das Natriumhuminat.

Somit kann gesagt werden, wenn man die wohl in der Fehlerbreite liegenden Unterschiede vernachlässigt, daß ein größerer hyaluronidasehemmender Effekt bei kombinierter Anwendung am Menschen nicht vorhanden ist. Als vergleich zeigte das 20-Minuten-Bad in einem Netzmittel keinerlei hyaluronidasehemmende Wirkung.

Zusammenfassung

Mit Hilfe einer Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel-Methode, die auf dem sogenannten Spreadingeffekt beruht, konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, daß eine Wirkungssteigerung cutan applizierter Salizyl- und Huminsäure bei kombinierter Anwendung am Menschen nicht festgestellt werden kann.

Literaturverzeichnis

- 1) Armentano, L. u. Mitarb.: Dtsch. med. Wschr. 62, 1325 (1936)
- 2) Astapenko, M.G.: Ter. Arch. 22, 69 (1950)
- 3) Brown, E.E. u. Wasson, V.: J. Pediatr. St. Louis 18, 328 (1941)
- 4) Gibian, H.: Erg. d. Enzymforsch. 13, 1 (1954)
- 5) Mathies, H.: Med. Klin. 52, 1676 (1957)
- 6) Mathies, H.: Zschr. Rheumaforsch. 18, 205 (1959)
- 7) Mathies, H.: Pharmazie 14, 429 (1959)
- 8) Mathies, H.: Med. Mschr. 10, 685 (1958)
- 9) Mathies, H. u. v. Werther, G.: Zschr. angew. Bäder-Klimahk. 8, 503 (1958)
- 10) Mathies, H.: Zschr. f. Rheumaforsch. im Druck
- 11) Mathies, H.: Zschr. f. Rheumaforsch. 18, 205 (1959)
- 12) Maeder, K.: Med. Klin. 50 (1955) 1679
- 13) Guerra, F.: Science 103, 686 (1946)
- 14) Guerra, F.: J. of Pharmacol. 87, 193 (1946)
- 15) Guerra, F.: Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. 87, 3 (1946)
- 16) Kvasniewski: zit. Fähndrich, W.H.: Medizinische (1952) 1453
- 17) Guerra, F.: Science 103, 686 (1946)
- 18) Schoen, R.: Ärztl. Forb. (1954), 1
- 19) Dry und Butt: zit. Pantlitschko, M. u. Kaiser, E.: Biochem. Zschr. 332, 137 (1951); Proc. Staff Meeting Mayo Clinic 21, 26 (1946)
- 20) Guerra, F.: J. Pharmacol. 87, 193 (1946)
- 21) Guerra, F.: Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. 87, 3 (1946)
- 22) Dorfman, E. u. Mitarb.: Amer. J. Dis. Child. 77, 106 (1949)
- 23) Swyer: zit. Pantlitschko, M. u. Kaiser, E.: Biochem. Zschr. 332, 137 (1951); Biochem. J. 42, 32 (1948)
- 24) Forrest u. Mitarb.: zit. Pantlitschko, M. u. Kaiser, E.: Biochem. Zschr. 332, 137 (1951); J. Pharmacy Pharmacol. 4, 231 (1952)
- 25) Lutz, D.: Diss. München 1961
- 26) Windsheimer, M.: Diss. München in vorbereitung

Herrn Professor Dr. W. Seitz danke ich für die Überlassung des
Themas; ebenso danke ich Herrn Dr. H. Mathies für die Anregungen
zu dieser Arbeit und Unterstützung bei der Ausführung sowie
Herrn Dipl.-Math. K. Liebrich für die statistische Berechnung
der Versuchsergebnisse.

Am 16.3.1938 wurde ich als erstes Kind des Amtsgerichtsrat Dr. J. Probst und seiner Ehefrau Doris geb. Kieffer in München geboren.

Von 1944 bis 1948 besuchte ich die Volksschule in Weilheim/Obb., von 1948 bis 1957 das dortige humanistische Gymnasium, das ich im Juni 1957 nach bestandener Reifeprüfung verließ.

Im Wintersemester 1957/58 begann ich das Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München und bestand dort im Wintersemester 1958/59 die Naturwissenschaftliche Vorprüfung, im Wintersemester 1959/60 die ärztliche Vorprüfung. Nach dem Wintersemester 1962/63 werde ich dort das medizinische Staatsexamen ablegen.

Am 10. 9. 1963 habe ich dort das medizinische Staatsexamen bestanden.

